

Degradação da ocratoxina A por um extracto enzimático isolado a partir de *Aspergillus niger*

Luís Abrunhosa & Armando Venâncio

Centro de Engenharia Biológica, Universidade do Minho, Campus de Gualtar, 4710-057
Braga, Portugal

(E-mail: luisjap@deb.uminho.pt; avenan@deb.uminho.pt)

Sumário

A ocratoxina A (OTA) é uma micotoxina produzida por diversas espécies dos géneros *Aspergillus* e *Penicillium* encontrada com frequência em rações animais e em certos produtos alimentares para consumo humano. Quimicamente, esta micotoxina é constituída por uma molécula de ocratoxina α (OT α) que se encontra unida por uma ligação peptídica a uma molécula de fenilalanina. A OTA possui diversas propriedades tóxicas, sendo a sua nefrotoxicidade a mais citada, ao contrário da OT α que não possui efeitos tóxicos relevantes e conhecidos. A OTA pode ser hidrolisada enzimaticamente por forma a clivar esta ligação peptídica e, assim, reduzir a sua toxicidade. Este trabalho descreve a produção, a partir de uma estirpe de *Aspergillus niger*, de um extracto enzimático capaz de hidrolisar o ocratoxina A, assim como a sua purificação parcial. A actividade enzimática deste extracto foi comparada com a actividade da carboxipeptidase A (CPA), cuja acção hidrolítica sobre a OTA está bem documentada. Verificou-se que o extracto de *A. niger* possui uma actividade específica de 32,5 U/mg e que a CPA possui uma actividade específica de 2,7 U/mg. Além do mais, verificou-se que o extracto de *A. niger* actua a um pH óptimo de 7,5, enquanto que a CPA actua a um pH óptimo de 8,5. Testou-se também a actividade destas duas enzimas na presença de dois inibidores específicos de proteases (EDTA e PMSF). Verificou-se que ambas foram fortemente inibidas pelo EDTA, mas não pelo PMSF.

Introdução

A ocratoxina A (OTA) é uma micotoxina produzida por diversas espécies dos géneros *Aspergillus* e *Penicillium* passível de ser encontrada em rações animais ou em produtos alimentares para consumo humano, como, por exemplo, cereais, vinho, passas, café, figos secos, cerveja ou cacau. A OTA tem propriedades nefrotóxicas, teratogénicas, hepatotóxicas, imunossupressoras e carcinogénicas. Está associada à hipertrofia dos rins em suínos e está classificada pelo IARC como agente carcinogénico pertencente ao grupo 2B, ou seja, com evidências claras em animais mas sem evidências suficientes em seres humanos (Ringot *et al.* 2006). A OTA é facilmente absorvida através do aparelho digestivo, mas é dificilmente eliminada pelos rins e outras vias de excreção, uma vez que possui uma grande afinidade para a albumina do plasma sanguíneo. Esta é um composto cumulativo, que possui tempos médios de vida bastantes grandes, sendo no caso do ser humano de 35 dias (Ringot *et al.* 2006).

A OTA é composta por uma isocumarina e uma molécula de fenilalanina que estão unidas por uma ligação amida semelhante às ligações peptídicas (Figura 1). Esta

isocumarina é conhecida como ocratoxina α (OT α) e não possui efeitos tóxicos relevantes, segundo a literatura disponível. A OT α é eliminada pelo organismo com mais facilidade do que a OTA. Por exemplo, em ratos a OT α possui um tempo médio de vida de 9,6 horas, enquanto que a OTA um de 103 horas (Li *et al.* 1997). Sendo assim, a hidrólise da ligação amida presente na molécula da OTA reduz a sua toxicidade. Esta hidrólise pode ser feita utilizando meios químicos, microbiológicos ou enzimáticos. Quimicamente, esta é hidrolisável por refluxo durante 48 h. em ácido clorídrico (6 N) aquecido (van der Merwe *et al.* 1965). Microbiologicamente, por acção de microrganismos tais como leveduras (Schatzmayer *et al.* 2003), fungos filamentosos (Abrunhosa *et al.* 2002; Varga *et al.* 2000), bactérias (Piotrowska and Zakowska 2000; Wegst and Lingens 1983) ou protozoários (Özpınar *et al.* 2002). Enzimaticamente, pela acção da carboxipeptidase A de pâncreas bovino ou por enzimas proteolíticas de *A. niger* e de pâncreas de suínos (Abrunhosa *et al.* 2006).

Este trabalho descreve a produção e purificação parcial de um extracto enzimático, capaz de hidrolisar a OTA, obtido a partir de uma estirpe de *Aspergillus niger*.

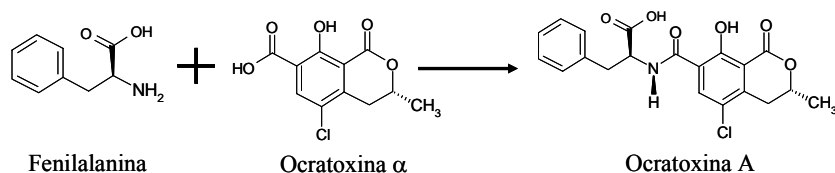


Figura 1. Constituição da estrutura química da ocratoxina A.

Material e métodos

Material biológico

Aspergillus niger MUM 03.58, não produtor de ocratoxina A, e *A. alliaceus* MUM 03.55, produtor de ocratoxina A, ambos isolados a partir de uvas.

Padrões

Ocratoxina A (Sigma); Carboxipeptidase A (EC 3.4.17.1) de pâncreas bovino (Sigma, type II-PMSF)

Obtenção do extracto enzimático

O extracto enzimático foi obtido segundo o procedimento descrito por Abrunhosa e co-autores (2006). Resumidamente, a estirpe *A. niger* MUM 03.58 foi inoculada e incubada durante 10 dias a 25 °C em 30 g de germen de trigo dextrinado com 45% de humidade, onde previamente tinha crescido a estirpe *A. alliaceus* MUM 03.55. Este procedimento permitiu criar um meio rico em OTA de forma a ser induzida a enzima em estudo. O fermentado obtido foi de seguida misturado com 100 ml de tampão a pH 5,6 (suplementado com 0,24 mM de Triton X100) e o homogeneizado daí resultante filtrado e centrifugado de forma a separar a fracção líquida dos resíduos sólidos. A fracção líquida foi concentrada por liofilização e a fracção proteica presente na amostra precipitada com acetona fria. Finalmente, o pellet proteico foi ressuscitado em 10 ml de tampão fosfato a pH 7,5.

Quantificação da actividade hidrolítica sobre a OTA

A quantificação da actividade enzimática foi realizada de acordo com Abrunhosa *et al.* (2006). Resumidamente, prepararam-se soluções com 1 $\mu\text{g/ml}$ de OTA em tampões a pH 3,0; pH 5,6; pH 7,5; pH 8,5 e pH 10,0; todos suplementados com 0,1% de azida sódica. As reacções de hidrólise foram iniciadas adicionando 20 μl de extracto enzimático (= 0,1 mg de proteína) a 1 ml de cada solução e decorreram a 37 °C, durante 25 horas. Realizaram-se, nas mesmas condições, ensaios com 0,5 mg/ml de CPA e brancos sem enzima. Em paralelo, e apenas para pH 7,5, realizaram-se ensaios na

presença de 10 mM de EDTA ou 1 mM de PMSF. Recolheram-se amostras ao longo do tempo, que foram analisadas para quantificar a OTA e a OT α . A identidade da OT α foi confirmada por hidrólise da OTA com CPA.

A actividade específica das enzimas foi calculada considerando que 1 unidade de actividade por mg de proteína (U/mg) representa a formação de 1 ng/min de OT α a 37 °C por cada mg de enzima utilizada. Utilizou-se para tal a OT α detectada ao fim de 3 horas de incubação.

Purificação por FPLC

Utilizou-se uma resina aniónica Macro-Prep High Q (Biorad), para preparar uma coluna de cromatografia. A fase móvel seleccionada foi 100 mM de tampão fosfato a pH 7,5 e a eluição decorreu com um gradiente de NaCl até 1 M, em 60 min, a um caudal de 0,5 ml/min (Figura 5.D). Injectaram-se 200 μ l do extracto de *A. niger* na coluna e recolheram-se amostras de 2 em 2 min. Em cada amostra quantificou-se a proteína total (método de Bradford) e a actividade hidrolítica sobre a OTA. Para tal, adicionou-se 1 μ g de OTA a cada amostra e incubaram-se a 37 °C durante 15 horas. A OTA e OT α foram quantificadas por HPLC como descrito em Abrunhosa et al. (2006). O sistema de FPLC era constituído por duas bombas Pharmacia LKB P-500 e um controlador LCC-500 plus, acoplados a um detector Diode Array Merck-Hitachi L-7455.

Resultados e discussão

Nos ensaios de actividade hidrolítica realizados, verificou-se uma diminuição dos conteúdos de OTA ao longo do tempo, sendo esta diminuição acompanhada por um aumento de OT α (Figura 2). A pH 7,5 verificou-se que o extracto de *A. niger* foi capaz de hidrolisar muito rapidamente a OTA, tendo-se registado uma actividade específica de 32,5 U/mg. Esta actividade é cerca de 12 vezes maior à observada para a CPA, cuja actividade específica registada para pH 7,5 é de 2,7 U/mg.

Ambas as enzimas foram capazes de hidrolisar a OTA a pH 5,6, 7,5 e 8,5 (Figura 3). No entanto, o pH óptimo para a actividade das enzimas é de 7,5 para o extracto de *A. niger* e de 8,5 para a CPA.

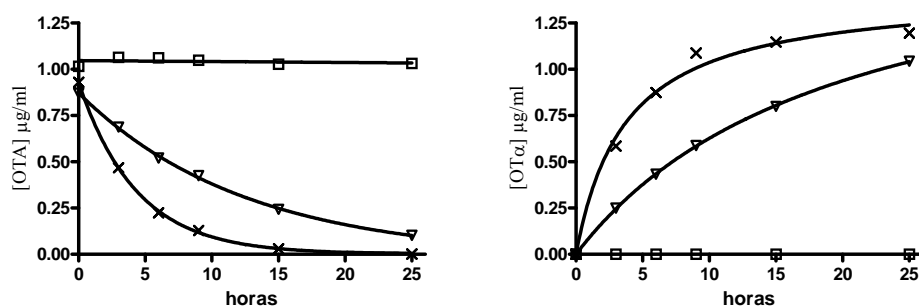


Figura 2. OTA e OT α quantificadas ao longo do tempo nos ensaios realizados com (- \times -) extracto de *A. niger* a pH 7,5; (- ∇ -) CPA a pH 7,5 e (- \square -) Branco a pH 7,5.

A actividade das duas enzimas na presença de EDTA, um inibidor específico das metalo-proteases, e de PMSF, um inibidor específico das proteases serínicas permitiu avaliar a natureza da actividade da enzima presente no extracto de *A. niger*. Verificou-se, que ambas foram fortemente inibidas pelo EDTA (96 % para a CPA e 99 % para o extracto) e que o PMSF não teve efeito inibidor considerável (Figura 3). A CPA é uma metalo-carboxypeptidase que é inibida pelo EDTA, tal como se verificou nos nossos ensaios com OTA. Tudo indica que a enzima presente no extracto de *A. niger* necessita também da presença de iões metálicos para poder actuar sobre a OTA uma vez que foi inibida de igual forma pelo EDTA.

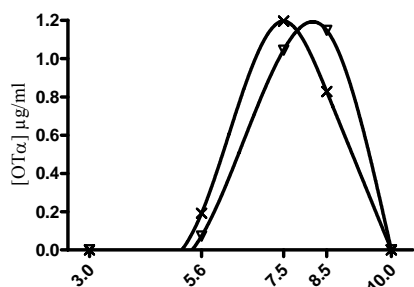


Figura 3. OTA α quantificada nos ensaios realizados a diferentes pH após 25 horas de incubação com (-x-) Extracto de *A. niger* e (-v-) CPA.

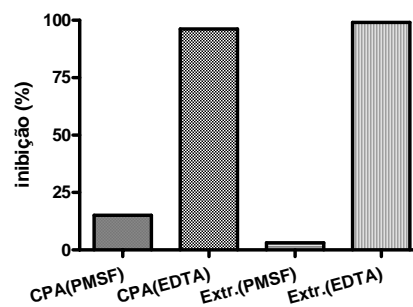


Figura 4. Inibição da actividade das enzimas registada após 25 h. a pH 7,5 e 37 °C na presença de 1 mM de PMSF e 10 mM de EDTA (expresso em percentagem).

O extracto enzimático foi parcialmente purificado, utilizando-se uma resina aniónica. No cromatograma obtido (Figura 5.A), observa-se um pico predominante com tempo de retenção de 31,4 min. Nas amostras recolhidas entre os 27 e 37 min, referentes a esse pico, detectou-se a maior parte da proteína presente na amostra inicial (Figura 5.B) e da actividade hidrolítica sobre a OTA (Figura 5.C). Sendo assim, a enzima presente no extracto de *A. niger* e responsável pela hidrólise da OTA apresenta uma boa afinidade para esta resina aniónica. Este procedimento poderá permitir, no futuro, um aumento de escala de forma a isolar maiores quantidades de enzima pura.

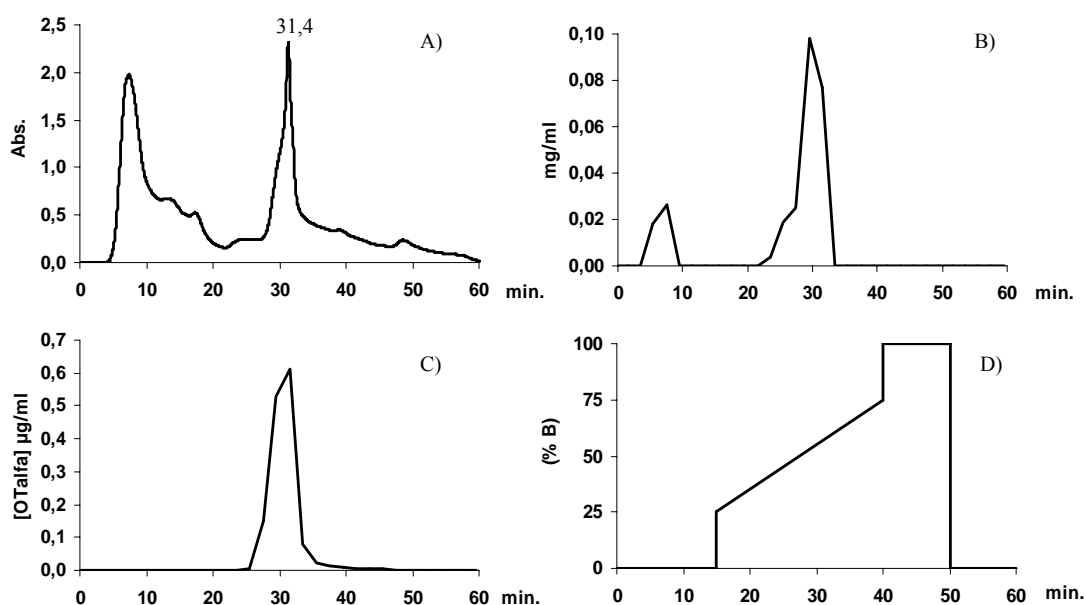


Figura 5. A) Comatograma obtido por FPLC; B) Proteína detectada nas amostras recolhidas; C) Actividade hidrolítica sobre a OTA detectada nas amostras; D) Gradiente de NaCl utilizado no FPLC.

Conclusão

Isolou-se a partir de uma estirpe de *A. niger* um extracto enzimático capaz de hidrolisar a OTA. Este extracto apresentou a pH 7,5 uma actividade específica de 32,5 U/mg de proteína. A enzima presente no extracto parece actuar de forma semelhante à carboxipeptidase A, uma vez que são ambas inibidas pelo EDTA. Esse extracto foi ainda parcialmente purificado por FPLC, o que irá permitir no futuro realizar mais estudos sobre a enzima em causa. A ocratoxina A é uma micotoxina que se encontra presente em diversos produtos alimentares estando-se neste momento a avaliar a aplicação desta enzima para reduzir os seus níveis nalguns produtos.

Agradecimentos

Luís Abrunhosa agradece a bolsa SFRH/BD/11228/2002 da Fundação para a Ciência e Tecnologia – FCT, Portugal.

Bibliografia

- Abrunhosa, L., Santos, L. and Venâncio, A. (2006) Degradation of Ochratoxin A by proteases and a crude enzyme of *Aspergillus niger*. *Food Biotechnology* **in press**.
- Abrunhosa, L., Serra, R. and Venâncio, A. (2002) Biodegradation of ochratoxin A by fungi isolated from grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50**, 7493-7496.
- Li, S., Marquardt, R. R., Frohlich, A. A., Vitti, T. G. and Crow, G. (1997) Pharmacokinetics of Ochratoxin A and Its Metabolites in Rats. *Toxicology and Applied Pharmacology* **145**, 82-90.
- Özpınar, H., Bilal, T., Abas, I. and Kutay, C. (2002) Degradation of ochratoxin A in rumen fluid *in vitro*. *Medicine and Biology* **9**, 66-69.
- Piotrowska, M. and Zakowska, Z. The biodegradation of ochratoxin A in food products by lactic acid bacteria and baker's yeast. Bielecki, S., Tramper, J., and Polak, J. *Food Biotechnology. Progress in Biotechnology* **17**, 307-310. 2000. Amsterdam, Elsevier.
- Ringot, D., Chango, A., Schneider, Y. J. and Larondelle, Y. (2006) Toxicokinetics and toxicodynamics of ochratoxin A, an update. *Chemico-Biological Interactions* **159**, 18-46.
- Schatzmayer, G., Heidler, D., Fuchs, E., Mohnl, M., Täubel, M., Loibner, A. P., Braun, R. and Binder, E. M. (2003) Investigation of different yeast strains for the detoxification of ochratoxin A. *Mycotoxin Research* **19**, 124-128.
- van der Merwe, K. J., Steyn, P. S. and Fourie, L. (1965) Mycotoxins. Part II. The constitution of ochratoxins A, B, and C, metabolites of *Aspergillus ochraceus* Wilh. *Journal of Chemical Society* 7083-7088.
- Varga, J., Rigó, K. and Téren, J. (2000) Degradation of ochratoxin A by *Aspergillus* species. *International Journal of Food Microbiology* **59**, 1-7.
- Wegst, W. and Lingens, F. (1983) Bacterial degradation of ochratoxin A. *FEMS Microbiology Letters* **17**, 341-344.